

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-99565

⑬ Int.Cl.⁴

A 61 L 25/00
A 61 K 37/04

識別記号

ADA
ADS

庁内整理番号

A-6779-4C
8615-4C

⑭ 公開 平成1年(1989)4月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 フィブリン糊調製用キット

⑯ 特 願 昭62-257000

⑰ 出 願 昭62(1987)10月12日

⑱ 発 明 者	西 槇	秀 雄	奈良県橿原市上品寺町412-4
⑱ 発 明 者	武 智	和 男	大阪府大東市川中新町25-308
⑱ 発 明 者	平 尾	豊	大阪府高槻市安岡寺町1-64-9
⑱ 発 明 者	上 村	八 尋	大阪府枚方市三矢町5-18-215
⑲ 出 願 人	株式会社ミドリ十字		
⑲ 代 理 人	弁理士 高 島 一		

明 細 書

1. 発明の名称

フィブリン糊調製用キット

2. 特許請求の範囲

フィブリノゲンおよびトロンビンからなるフィブリン糊調製用キットにおいて、さらにフィブロネクチンをフィブリノゲン100重量部当たり5～50重量部の割合で添付してなることを特徴とするキット。

3. 発明の詳細な説明

〔利用分野〕

本発明はフィブリノゲン、トロンビンおよび特定量のフィブロネクチンからなるフィブリン糊調製用キットに関する。

〔従来技術〕

フィブリン糊 (adhesive) は、ヒト血漿から精製したフィブリノゲンを溶解し、これにヒト血漿から精製させて生じるフィブリンが組織接着性を有することを利用している。

血液に含まれるフィブリノゲンは組織が創傷を

受けたとき他の血液成分と共に創傷面の毛細血管から流出して組織間を充填し、血液中のトロンビンと作用し合って不溶性のフィブリンとなり、これが創傷面を膠着させる働きをもっている。この膠着作用により創傷面に繊維芽細胞が発生しやすくなり、これがやがて繊維細胞となって組織が固定し、創傷面は治癒する。

フィブリン糊は下記の如き特性を有している。

- ・生理的機作を応用した接着剤である。
- ・接着が迅速である。
- ・接着に過度の熱および圧力を必要としない。
- ・接着部位の水分とは無関係に接着が可能である。
- このため、フィブリン糊は次の如き用途に有用である。
- ・出血している創傷のシール
- ・神経、腱、血管などの接着または縫合補強
- ・骨切片の固定
- より具体的適用範囲としては次の如きものが挙げられる。
- ・硬膜接着

- ・神経吻合
 - ・微小血管吻合
 - ・血管縫合の保全
 - ・外傷性鼓膜欠損の開鎖
 - ・代用血管の封鎖および縫合部位の保全
 - ・肝臓破壊、肝試験切開部および胆嚢切開部の接着
 - ・腎臓部分切除、腎臓破壊および前立腺切除時の創傷処置
 - ・腸吻合の保全
 - ・裂皮膚弁の接着
 - ・骨および軟骨部創傷腔の開鎖（特に出血の危険性のある患者）
 - ・軟骨および骨部接着
 - ・靭帯の補強
 - ・気胸時の胸膜の接着
 - ・出血の恐れのある場合、抜歯後歯槽封鎖
 - ・コラーゲン線維束を用いる扁桃窩の封鎖時（特に出血の危険性のある患者）
- フィブリン糊としては、従来フィブリノゲンお

た。

即ち、本発明はフィブリノゲンおよびトロンビンからなるフィブリン糊調製用キットにおいて、さらにフィブロネクチンをフィブリノゲン100重量部当たり5～50重量部の割合で添付してなることを特徴とするキットに関する。

（フィブリノゲン）

本発明で使用されるフィブリノゲンは、通常ヒトまたは動物の血漿から得られる。生体適合性の観点からヒトを対象とする場合にはヒトの血漿から得られるフィブリノゲンを、また動物を対象とする場合にはその動物の血漿から得られるフィブリノゲンを原料として用いる方が好ましい。

かようなフィブリノゲンとしては、たとえば厚生省薬務局監修の生物学的製剤基準（1979年第201～203頁）に従って製造された医療用乾燥フィブリノゲンを使用することができる。

（トロンビン）

トロンビンは、通常トロンビンとしての生物活性または生理活性を有するもの、たとえば血漿蛋

白およびトロンビンを主成分とするものが知られている。

（発明が解決しようとする問題点）

ところが、上記公知のフィブリン糊は、フィブロプラストなどへの浸潤が必ずしも良好でない、ワウンド・ヒーリング（wound-healing）が早いとはいえない、接着力の持続性が良好でない等の問題点を有しており、従って創傷治癒において必ずしも満足しうるものではない。

本発明の目的は、フィブロプラストなどへの浸潤が良好、ワウンド・ヒーリングが早く、接着力が持続する等の特徴を有し創傷治癒効果にさらに優れたフィブリン糊調製用キットを提供することである。

（問題点を解決するための手段）

本発明者らは、上記目的を達成べく種々研究を行った結果、従来のフィブリン糊の主要組成であるフィブリノゲンおよびトロンビンに、特定量のフィブロネクチンを添加することにより、所期の目的を達成できることを見出し、本発明を完成し

白を分画して得られるものなどが使用される。

すなわち、たとえばヒトまたはウシの血漿から精製したプロトロンビンに Ca^{++} の存在下で、トロンボプラスチン、ヘビ毒などを作用させて調製したものを用いることができる。また、市販の薬局方収載品を用いてもよい。

（フィブロネクチン）

フィブロネクチンは線維芽細胞膜蛋白（fibronectin）と呼ばれており、血漿の他線維芽細胞などの間葉系細胞や表皮などの基底膜に存在する糖蛋白である。

血液凝固に際しては、血液凝固第Ⅶ因子のトランスグルタミナーゼの作用によりフィブリンのγ鎖間結合が促進され、フィブリンの架橋が形成される。この際、同じ第Ⅶ因子の触媒作用により、フィブロネクチンを通じてフィブリンのα鎖間の架橋が形成され、これにより血液凝固はより完全なものとなる。フィブロネクチンはまた細胞間、細胞支持組織間を粘着あるいは結合させる作用があり、創傷治癒促進の薬理効果がある。

フィブロネクチンとしては、一般に血漿蛋白の分離、線維芽細胞、その培養液等から分離することによって得られたものなどが使用される。

本発明で使用されるフィブロネクチンは、医薬品として提供しうる程度に精製されておればよい。

その調製法としては、特開昭57-140724号公報、特開昭58-121220号公報、特開昭59-67228号公報などに記載の方法が挙げられる。

(その他の成分)

本発明のキットには、必要に応じて安定化剤、凝溶阻害剤、溶解剤等を追加添付することもできる。

本発明で用いられる安定化剤としては、糖、糖アルコール、アミノ酸、非イオン系界面活性剤などが挙げられる。

糖としては、単糖類(グルコース、ガラクトース、フルクトースなど)、二糖類(ショ糖、ラクトース、マルトースなど)、多糖類(デンプン、デキストリン、セルロースなど)が挙げられる。

糖アルコールとしては、ソルビトール、マンニ

チン1~100重量部に対して10~100重量部程度が例示される。

凝溶阻害剤としては、ε-アミノカプロン酸、アプロチニン、アンチトロンビンⅡ、尿由来トリプシン阻害剤等を用いることができる。

なお、凝溶阻害剤は二種以上を併用することができる。また、フィブリノゲン、トロンビン、フィブロネクチン、溶解剤のいずれか一つに添加しておくこともできる。

溶解剤としては、注射用蒸留水、注射用生理食塩水、pH5~8の緩衝液(リン酸系、クエン酸系など)などが用いられる。また、キットを粉末製剤として用いる場合、当該溶解液は不要となる。

(キットの調製)

本発明のキットはフィブリノゲン単独または他の成分よりなる組成物(A成分)、フィブロネクチン単独または他の成分よりなる組成物(B成分)およびトロンビン単独または他の成分よりなる組成物(C成分)のそれぞれ(好ましくはその乾燥粉末)の成分を、単独に、またはこれらのA~C

トール、キシリトールなどが挙げられる。

アミノ酸としては、中性アミノ酸(グリシン、アラニン、セリン、スレオニンなど)、酸性アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸など)、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジンなど)などが挙げられる。

非イオン系界面活性剤としては、ポリオール脂肪酸エステル(Span等)、そのポリエチレングリコール縮合物(Tween等)、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体(Pluronic等)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(HCO等)などが挙げられる。

安定化剤は二種以上を併用することができる。また、フィブリノゲン、トロンビン、フィブロネクチンのいずれかまたは全てに添加することもできる。

これらの安定化剤の添加量としては、フィブリノゲン1重量部に対して0.5~5重量部、好ましくは1~2重量部、トロンビン50~1000単位(u)に対して10~100mg、フィブロネク

チンの二種または全成分の混合物として提供される。キットには、通常さらに溶解剤が添付され、通常用時溶解剤に溶解して使用されるが、予め各成分を溶媒で溶解しておいてもよい。

本発明キットないしは当該キットを使用して得られるフィブリン凝組成物におけるフィブリノゲン、トロンビンおよびフィブロネクチンの量的割合は通常フィブリノゲン10~100mg当たり、トロンビン1~500単位(u)、フィブリノゲン100重量部当たりフィブロネクチン5~50重量部である。

本発明キットを、たとえばA成分、B成分およびC成分それぞれを別個に包装したキットとする場合には、その各包装単位における各成分の割合は上記量比に特定されず任意の割合として包装してもよく、その場合フィブリン凝の調製時に、上記の割合となるように各成分を配合すればよい。

なお、A成分、B成分およびC成分を予め配合したキットにおいては、A成分、B成分およびC成分の混合物のみよりなる変則キットとなり、ま

たその場合には溶解剤を添付してもよい。

たとえばA成分、B成分およびC成分それぞれを別個に包装したキットを使用するフィブリン糊の具体的な調製方法としては、たとえばフィブリンゲン100重量部当たり5~50重量部のフィブロネクチンを添加し、この水溶液（フィブリンゲンとして1~10w/v%程度）にトロンビン1~500単位(u)/mlを加えてフィブロネクチン含有フィブリン糊を作成する方法が例示される。

(効果)

本発明により、従来の組成のフィブリン糊と比べてフィブロblastなどへの浸潤が良好、ワウンド・ヒーリング(wound-healing)が早い、接着力が維持する、などの特徴を有し創傷治癒効果にさらに優れたフィブリン糊を提供することができる。

(実施例・実験例)

本発明をより詳細に説明するために、実施例および実験例を挙げるが、本発明はこれらによって

・注射用蒸留水(局方品)

(2)調製方法

乾燥人フィブリンゲン1gにフィブロネクチン100mgを添加し、注射用蒸留水12mlを加えて溶解する(A液)。

別に、トロンビン4μ/ml、アプロチニン3000KIE/ml、塩化カルシウム40mMからなる溶液を調製する(B液)。

A液とB液を混合し、直ちに組織に塗布する。

参考例1

プールした正常成人血漿よりエタノール分画して得られる画分-1より適当な方法でCIGを精製する。たとえば松田ら(Ann. N.Y. Acad. Sci., 312, 74, 1978年)の方法に従い画分-1を0.055Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0に溶解し、これにプラスミンによるCIGの分解を防ぐために0.01MのEACA(イブシロン・アミン・アミノカプロン酸)およびアプロチニン10単位/mlを加え、更に臭化シアンで活性化させたセファロースにリジンをカップルさせたりジナーセファロ

スに限定されるものではない。

実施例1

(1)使用製剤

・乾燥人フィブリンゲン

(フィブリンゲン-ミドリ、ミドリ十字社製、一瓶中凝固型蛋白1g含有、HBs抗原陽性のものを除外した健康人血漿のみを用いて、Cohnの低温エタノール分画法により得られたフィブリンゲン画分を除菌濾過の後紫外線照射処理を施し、小分後真空凍結乾燥した製剤)

・局方トロンビン

(トロンビン-ミドリ、ミドリ十字社製、一瓶中トロンビン500単位含有、HBs抗原陽性(RPHA法)のものを除外したヒト血漿よりプロトロンビンを分離精製した後、カルシウムイオンの存在下でトロンボプラスチンを作用させて製し、滅菌して凍結乾燥したもの)

・フィブロネクチン(参考例により調製)

・塩化カルシウム液

・アプロチニン注射液

ースによりプラスミンおよびプラスミノゲンを除去したのち、ヘパリン10単位/mlを加えて0~2℃に48時間静置して沈澱を集める。沈澱は0.05Mリン酸緩衝液、pH6.0と1Mグリシンおよび6.5%エタノールを含む0.055Mクエン酸緩衝液とでそれぞれ洗浄して可溶性蛋白を除去したのち、0.055Mクエン酸緩衝液、pH6.35を加えて室温にもたらし、沈澱を溶解させる。これを初めと同様0~2℃に放置後沈澱を分けとり洗浄する操作を3回繰り返して、最後に沈澱としてフィブロネクチンを含有する画分クリオプレシビテートを得る。

クリオプレシビテート(沈澱)をクリオプレシビテートを集めるのに用いた原料画分-1の重量の2倍量の0.05Mトリス-リン酸緩衝液、pH7.0に溶解し、これを0.05Mトリス-リン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したDEAE-セファデックスに吸着させ、同一緩衝液および0.09Mトリス-リン酸緩衝液、pH7.0で洗浄して夾雑蛋白を除去したのち、0.2Mトリス-リン酸緩衝液、pH7.0で

フィブロンクチンの溶出を行う。

実験例 1

ウィスター系ラットの背部にⅡ度熱傷を作成
(①背部を削毛②直径4 cmの金属管をラットに接
触③金属管中に80度の熱湯を15秒間入れ熱傷
惹起)、本発明のキットを使用して得られたフィ
ブリン糊(実施例1)、従来組成のフィブリン糊
(実施例1の組成からフィブロンクチンを除いた
もの)を各々、熱傷面に塗布した上に、大腸菌含
有家兎便を塗布して、5日後に上皮化の程度を観
察、比較した。その結果、本発明のものの場合、
術後5日で90%の上皮化率を示したが、従来組
成では65%であった。従って、本発明のキット
を使用して得られたフィブリン糊は従来品に較べ
て接着性・熱傷創保護等の何れの点においても優
れていることが判明した。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高 島

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第257000号

2. 発明の名称

フィブリン糊調製用キット

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

4. 代理人 ⑤541

住所 大阪市東区平野町4丁目56番地
(湯木ビル)

TEL (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士 (8079) 高 島

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の器

6. 補正の内容

(1) 明細書第4頁第6行および第11行の

「ワウンド」を「ウーンド」に訂正する。

(2) 明細書第4頁第16行の「達成」の後に

「す」を加入する。

(3) 明細書第5頁第13行の「方」を削除する。

(4) 明細書第11頁第13～14行の「ワウンド」

を「ウーンド」に訂正する。

(5) 明細書第13頁第6行の「μ」を「単位」

に訂正する。

(6) 明細書第13頁第18行の「単位」を

「KIE」に訂正する。

BEST AVAILABLE COPY